

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/62963 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00812

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Februar 2001 (27.02.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 10 376.6 28. Februar 2000 (28.02.2000) DE
100 53 393.0 20. Oktober 2000 (20.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **ORIGEN BIOTECHNOLOGY AG** [DE/DE];
Münzstrasse 23, 10178 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ÖZKAN, Derya**
[DE/DE]; Münzstrasse 23, 10178 Berlin (DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Gelfertstrasse
56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IMMOBILIZING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for immobilizing nucleic acids on one of the surfaces of a non-porous organic polymeric material which does not carry any primary and/or secondary amine groups. The inventive method comprises the following steps: (a) an aqueous solution containing a nucleic acid as well as a dissolved salt is prepared, whereby the cation of the salt is selected from the group comprised of sodium, magnesium and of mixtures of these cations; (b) the solution mentioned in step (a) is brought into contact with the surface of the polymeric material, and; (c) the surface of the polymeric material, which is in contact with the solution, is irradiated with UV light after step (b) or simultaneously thereto.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt ein Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer Oberfläche eines nichtporösen organischen Polymerwerkstoffs, welcher keine primären und/oder sekundären Amingruppen trägt, mit den folgenden Verfahrensstufen: (a) es wird eine wässrige Lösung enthaltend eine Nukleinsäure sowie ein gelöstes Salz, wobei das Kation des Salzes ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Natrium, Magnesium und Mischungen dieser Kationen", hergestellt, (b) die Lösung aus Stufe (a) wird mit der Oberfläche des Polymerwerkstoffs kontaktiert, (c) nach oder gleichzeitig mit Stufe (b) wird die Oberfläche des Polymerwerkstoffs, welche in Kontakt mit der Lösung steht, mit UV-Licht bestrahlt.

WO 01/62963 A2

Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer Oberfläche eines organischen Polymerwerkstoffs mit den folgenden Verfahrensstufen: a) es wird eine wäßrige Lösung enthaltend eine Nukleinsäure hergestellt, b) die Lösung aus Stufe a) wird mit der Oberfläche des Polymerwerkstoffs kontaktiert, c) nach oder gleichzeitig mit Stufe b) wird die Oberfläche des Polymerwerkstoffs, welche in Kontakt mit der Lösung steht, mit UV-Licht bestrahlt, ein Immobilisat, erhältlich mittels eines solchen Verfahrens, sowie die Verwendung eines solchen Immobilisats.

20 Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik.

In vielen Bereichen der Biochemie ist es erforderlich, Nukleinsäuren, insbesondere kurze Oligonukleotide mit 20 bis 200 Nukleotiden, durch Bindung an einem Substrat zu immobilisieren. Ein typischer Anwendungsbereich ist durch die sogenannten Nukleinsäurechips gegeben, bei welchen verschiedene Nukleinsäuren in verschiedenen Arealen, mit entsprechender Zuordnung, einer Oberfläche eines Substrates bzw. Trägerbauteiles gebunden sind. Eine Bindung einer Nukleinsäure an eine Oberfläche eines Festkörpers kann grundsätzlich beispielsweise adsorptiv, durch Physisorption oder Chemisorption, erfolgen. Wünschenswerter ist jedoch

eine covalente Bindung, da diese vergleichsweise fest ist und ein störendes Herunterwaschen von gebundenen Nukleinsäuren in subsequenten Prozessierungs- oder Analysestufen unter üblichen Bedingungen zuverlässig 5 verhindert.

Die Literaturstelle Nagata et al., FEBS Letters 183:379-382, 1985, beschreibt die Adsorption geklonierter DNA mit ca. 40 kB an Polystyrol. Hierbei wurde in PBS 10 (8 mM Na_2PO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) mit 0,1 M MgCl_2 gearbeitet und erst nach Aspirieren mit UV bestrahlt. Ähnliches ist in den Literaturstellen FR2663040, US5510085 und Nikiforov et al., PCR Methods Applic. 3:285-291, 1994, beschrieben. Die Literaturstelle Keller et al., J. Clin. Microbiol. 29: 15 638-641, 1991, beschreibt die Adsorption von Phagen DNA mit ca. 7 kB an Plastikmaterialien. Die Literaturstelle Nikiforov et al., Nucleic Acids Res. 22: 4167-4175, 1994 beschreibt die Adsorption von Oligonukleotiden über eine über kationische Detergenzien 20 vermittelte Bindung. In diesem Stand der Technik handelt es sich bei den Nukleinsäuren typischerweise um längere DNA Fragmente mit meist bedeutend mehr als einigen kB.

25

Chemisch aktivierte Substratoberflächen aus Polymerwerkstoffen, einschließlich Polystyrol, sowie zur covalenten Bindung daran geeignete biologisch aktive Substanzen sind beispielsweise in den Literaturstellen 30 US4736019, US4657873, US4654299, US4419444 und US4081329 beschrieben. Eine chemische Funktionalisierung von Polystyrol ist auch in den Literaturstellen

US3956219, US3886486, US3974110, US3995094 und
US4226958 beschrieben.

Die Literaturstelle Church et al., Proc. Natl. Acad.
5 Sci. USA 81:1991-1995, 1984, beschreibt eine foto-
chemische Methode zum Vernetzen genomischer DNA Frag-
mente auf Nylon Membranen. Aus der Literaturstelle
Saito et al., Tetrahedron Lett., 22: 3265-3268, 1981,
ist es bekannt, daß primäre Amingruppen mit lichtak-
10 tiviertem Thymidin hochreaktiv sind, und dieser Prozeß
wird als Grundlage des Mechanismus der covalenten
Bindung von Nukleotiden an Membranen angenommen. Die
Literaturstelle WO8911548 beschreibt ein Verfahren
sowie Reagenzien für die Immobilisierung von Oligonuk-
15 leotiden durch Bindung eines Polynukleotids, vorzug-
sweise eines Abstandshalters aus poly-dT, an eine
Nukleinsäure Probe und Fixierung des Abstandshalters
an einem Substrat mit primären oder sekundären Amin-
gruppen, beispielsweise Nylon) mittels UV-Bestrahlung.
20 Der Abstandshalter ist länger als die Nukleinsäure-
probe.

Im Rahmen der Maßnahmen des Standes der Technik ist es
regelmäßig erforderlich, eine Aktivierung der Ober-
25 fläche eines organischen Polymerwerkstoffes für eine
Reaktion mit einem Oligonukleotid durchzuführen
und/oder einen Polymerwerkstoff einzusetzen, welcher
primäre und/oder sekundäre Amingruppen trägt. Ersteres
ist störend aufwendig. In beiden Fällen stört zudem
30 eine verbleibende Reaktivität der Oberfläche aufgrund
von nicht abgebundenen reaktiven Oberflächensites.
Weiterhin handelt es im Rahmen der Maßnahmen des Stan-
des der Technik meist um lange DNA Fragmente, welche

immobilisierbar sind, während kurze Nukleinsäuren unter vergleichbaren Bedingungen offenbar nicht adsorbiert werden. Schließlich bieten die bekannten Maßnahmen eine lediglich adsorptive Bindung, welche
5 für verschiedene Anwendungen nicht ausreichend stabil ist.

Technisches Problem der Erfindung

10

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines Immobilisats mit an einem polymeren Werkstoff fest gebundenen Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotiden, anzugeben,
15 welches weder eine Aktivierung der Oberfläche des Werkstoffes mittels Aktivierungsreagentien oder dergleichen, noch einen per se aufgrund von primären und/oder sekundären Amingruppen reaktiven Werkstoff erfordert.

20

Grundzüge der Erfindung.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren mit weniger als 300 Basenpaaren an einer Oberfläche eines vorzugsweise nicht-porösen organischen Polymerwerkstoffs, welcher keine primären und/oder sekundären Amingruppen trägt, mit den folgenden Verfahrensstufen: a) es wird eine wäßrige
25 Lösung enthaltend eine Nukleinsäure sowie ein gelöstes Salz hergestellt, b) die Lösung aus Stufe a) wird mit der Oberfläche des Polymerwerkstoffs kontaktiert, c)

es wird die Oberfläche des Polymerwerkstoffs, welche in Kontakt mit der Lösung steht, mit UV-Licht bestrahlt. Nach der Stufe c) sind die Nukleinsäuren immobilisiert und die Lösung kann abgezogen werden.

5 Die Stufe c) kann gleichzeitig oder unmittelbar nach der Stufe b) durchgeführt werden. Wenn die Stufe c) unmittelbar nach der Stufe b) durchgeführt wird, so ist damit eine beispielsweise manipulationsbedingte Zeitspanne gemeint, welche typischerweise unter 30
10 min., meist unter 5 min., besser unter 1 min., liegt. Die Nukleinsäure kann weniger als 200, insbesondere weniger als 100 Basenpaare aufweisen.

Überraschenderweise gelingt die Immobilisierung an
15 Oberflächen von Polymerwerkstoffen, und zwar an nicht zuvor chemisch oder physikalisch aktivierten Oberflächen allein durch Vermittlung des in der die Nukleinsäure enthaltenden Lösung vorliegenden Salzes in Verbindung mit der UV-Licht Bestrahlung, und zwar ohne
20 daß vorher eine Adsorptionsverfahrenstufe und/oder Aspiration durchgeführt wird. Offenbar findet eine direkte, nicht-adsorptive Immobilisierung statt. Die Nukleinsäure läßt sich nach der Immobilisierung unter für die Prozessierung und/oder Analyse typischen
25 Bedingungen nicht mehr von der Oberfläche ablösen. Die Bindung der Nukleinsäure an der Oberfläche ist offenbar covalent.

Die Erfindung lehrt weiterhin ein Immobilisat mit
30 einem Polymerwerkstoff und einer an eine Oberfläche des Polymerwerkstoffes gebundenen Nukleinsäure, erhältlich mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei die Oberfläche planar oder die Mantelfläche

einer Polymerfaser ist, sowie die Verwendung eines solchen Immobilisats in einem Verfahren zur Hybridisierung von Nukleinsäuren, wobei die an der Oberfläche des Polymerwerkstoffes immobilisierte Nukleinsäure

5 eine Hybridisierungsregion aufweist, mit den folgenden Verfahrensstufen: a) die die Nukleinsäure tragende Oberfläche des Immobilisats wird mit einer die Benetzung der Oberfläche fördernden Lösung behandelt, b) ein Teil der die Nukleinsäure tragenden Oberfläche

10 des Immobilisats wird dann mit einer Hybridisierungslösung kontaktiert, wobei die Hybridisierungslösung die die Nukleinsäure tragende Oberfläche des Immobilisats selbsttätig vollständig benetzt. Im Benetzten Bereich erfolgt dann die Hybridisierung und ggf. deren

15 Detektion auf übliche Weise. Bei letztgenanntem Aspekt der Erfindung sind ein Detergenz und Salz an der Immobilisat Oberfläche gebunden (beispielsweise durch Block-Schritt). Die Hybridisierungslösung enthält Target und weist die Besonderheit auf, daß sie sehr wenig

20 Ionen enthält (beispielsweise weniger als 100 mM Salz Gesamtkonzentration) und darüber hinaus alkalisch ist (pH 8 - 14). Dadurch liegen doppelsträngige DNA/RNA Targets als Einzelstrang vor, der erst durch Einwirkung der an der Oberfläche des Immobilisats gebundenen Detergenzien und/oder Salze bindefähig wird. Bei

25 den eingesetzten Ionenstärken der Hybridisierungslösung tritt eine Hybridisierung an sich nämlich nicht auf. In diesem Zusammenhang ist ebenso wichtig, daß die Hybridisierungslösung mit nur kleinem Volumen

30 aufgebracht wird und sich als Kapillarfilm entlang der Oberfläche verteilt.

Die vorstehende Verwendung ist, bezogen auf den Einsatz einer die Benetzung fördernden Lösung, von selbstständiger Bedeutung, und zwar unabhängig von dem Einsatz des erfindungsgemäßen Immobilisats. Der Einsatz von die Benetzung einer Oberfläche fördernden Lösung im Zusammenhang mit Immobilisaten läßt sich nämlich grundsätzlich bei beliebigen Immobilisaten enthaltend biologisch aktive Substanzen bzw. Material, also auch beispielsweise solchen mit Proteinen, Peptiden und/oder Zuckern einsetzen. In jedem Falle wird erreicht, daß eine auf das Immobilisat aufgegebene Lösung, enthaltend einen Bindungspartner oder prospektiven Bindungspartner für das immobilisierte biologisch aktive Material, sich selbsttätig praktisch über die Oberfläche des Immobilisats, einen Kapillarfilm bildend, ausbreitet. Hierdurch wird weniger der aufzugebenden Lösung benötigt. Zudem wird bei Einsatz einer gleichen Menge einer Verbindung in der aufgegebenen Lösung ein stärkeres Signal bei Bindung erhalten, weil das Verhältnis Grenzfläche Lösung/Immobilisat zu Volumen der aufgegebenen Lösung aufgrund der Ausbildung eines Kapillarfildes erhöht wird. Die Analytik wird somit letztendlich empfindlicher.

Erfindungsgemäße Immobilisate lassen sich sowohl zur eigentlichen Analyse (Analysatcharakterisierung) als auch zur Vorbereitung einer Probe verwenden, beispielsweise zur Abtrennung von spezifischen Analysebestandteilen durch Festphasenbindung aus einem komplexen Gemisch, z.B. von genomischer DNA aus Blutproben oder RNA, etc, oder beispielsweise zur Anreicherung an der festen Phase, z.B. durch enzymatische Verfahren. Für letzteres kann z.B. eine

Bindungsstelle für ein Enzym, wie T7 DNA Polymerase, in das immobilisierte Oligonukleotid eingebaut werden.

5 Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

Nach der Verfahrenstufe c) kann eine Waschverfahrensstufe durchgeführt werden. Hiermit werden nicht (covalent) gebundene Nukleinsäuremoleküle gleichsam
10 abgewaschen bzw. desorbiert. Nach der Verfahrenstufe c) oder nach der Waschverfahrensstufe kann eine Spülverfahrensstufe mit einer wäßrigen Lösung enthaltend ein Detergenz durchgeführt werden. Mittels des Detergenz werden eventuelle reaktive Oberflächensites,
15 welche unbesetzt geblieben sind, abgesättigt bzw. blockiert, aber auch die Adhäsionskräfte zwischen einer subsequent aufgegebenen Lösung und dem Immobilisat gegenüber den Cohäsionskräften in der subsequent aufgegebenen Lösung erhöht und so die Benetzbarkeit
20 des Immobilisats erhöht, bis zu vollständigen Selbstbenetzung bzw. selbstständiger Ausbildung eines Kapillarfildes.

Der Polymerwerkstoff kann ausgewählt sein aus der
25 Gruppe bestehend aus "Polyethylen (PE), Polycarbonat (PC), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS), Polytheterephthalat (PETP), Polyethersulfon (PES), Polyetheretherketon (PEEK), Polyphenylenoxid (PPO), Polyphenylensulfid (PPS), Polybutylenterephthalat
30 (PBT, Polyoxymethylen (POM), Polysulfon (PSU), Polyetherimid (PEI), Polyamid (PA) und Mischungen sowie Copolymere der Monomere solcher Polymere", insbesondere ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus

"Polycarbonat (PC), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS) und Mischungen sowie Copolymere der Monomere solcher Polymere".

5 Die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung kann im Bereich von 0,0001 bis 1000 nM, vorzugsweise im Bereich von 1 bis 100 nM, liegen. Es versteht sich, daß auch verschiedene Nukleinsäuren eingesetzt werden können, jeweils in Konzentrationen, wie angegeben.

10

Die Gesamtkonzentration des gelösten Salzes in der Lösung liegt zweckmäßigerweise im Bereich von 0,1 bis 6 M, vorzugsweise im Bereich von 0,1 bis 3 M. Das Salz kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus
15 "MgCl₂, CaCl₂, NaCl, KCl, LiCl, NH₄HCO₃, NaHCO₃, Na₂CO₃, NH₄Cl, NaHPO₄, NaPi, NH₄Ac, NaAc, KAc, TrisHCl, HCl, Tris Base, KHSO₄, K₂S₂O₅, Tetraethylammoniumchlorid, MOPS, HEPES, Bernsteinsäure, Diethanolamin, Ethanolamin, NaHCO₃/NaCl/EDTA, PBS, TAE, Bisulfit, NaBorat,
20 und Mischungen dieser Stoffe". Als Salz ist ein Stoff bezeichnet, welcher in wäßriger Lösung in zumindest ein Anion und zumindest ein Kation dissoziiert. Das UV-Licht sollte eine Wellenlänge im Bereich 1 nm bis 480 nm, insbesondere 100 nm bis 300 nm, aufweisen. Die
25 Bestrahlungsdauer beträgt typischerweise 1 s bis 100 min, vorzugsweise 10 s bis 10 min., beispielsweise 0,5 bis 2 min.. Eine Strahlungsleistung, wie von einer 60 W UV-Lampe über 2 min. bei einem Abstand von 15 cm geliefert, ist durchaus ausreichend.

30

Das Detergenz kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "Tween 20, Triton X100, Brij-35, Sarkosyl, und Mischungen solcher Substanzen".

In der Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Immobilisats, wobei die Oberfläche die Mantelfläche einer Polymerfaser ist, sind eine Vielzahl von solchen Polymerfasern parallel oder mit in Richtung der Längserstreckung sich vergrößerndem Abstand zueinander angeordnet und fixiert, wobei die Mantelflächen benachbarter Polymerfasern einander nicht oder nur mit Punkt- oder Linienkontakt berühren und wobei die Zwischenräume zwischen den Polymerfasern so eng bemessen sind, daß sich in den Zwischenräumen eine Kapillaraszension subsequenz aufgegebener Lösungen von zumindest 0,1 mm einstellt.

Die die Benetzung fördernde Lösung kann ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe, wie im vorstehenden Absatz beschrieben, enthalten. Die Hybridisierungslösung weist vorzugsweise einen pH von 7 bis 9 auf. Die Einstellung des pH kann durch Einsatz von NaOH erfolgen.

Die Erfindung kann außer bei den üblichen planaren Biochips insbesondere im Zusammenhang mit besonderen Bauteilen eingesetzt werden mit folgendem Aufbau.

Das besondere Bauteil weist eine Mehrzahl von Fiberelementen (Fasern) und an den Fiberelementen immobilisierte Probenmoleküle selektierter Probenmolekülspezies oder selektierter Probenmolekülspeziesgruppen auf, wobei jedem Fiberelement eine spezifische Probenmolekülspezies oder Probenmolekülspeziesgruppe zugeordnet ist, und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Probenmoleküle an Zylindermantelflächen der Fiberelemente immobilisiert sind, und daß die

Fiberelemente mittels eines Tragelements in radialer Richtung, bezogen auf die Fiberelemente, gegeneinander beabstandet fixiert oder in Linienkontakt miteinander gebündelt sind. Die Fiberelemente können parallel zueinander als Fiberelementebündel angeordnet sein. Die Fiberelemente können optische Fiberelemente sein. Die Stirnflächen zumindest eines Endes der Fiberelemente, vorzugsweise beider Enden, können optisch kontaktierbar sein. Alternativ oder zusätzlich ist eine elektrische Kontaktierung möglich, beispielsweise zur Messung von Impedanzen bzw. Impedanzänderungen. Auch Auswertungen über Oberflächenplasmonenresonanz und Streuprozesse ist möglich. Die Fiberelemente können einen Durchmesser im Bereich von $0,01 \mu\text{m}$ bis $1000 \mu\text{m}$ und/oder eine Länge im Bereich von $0,1 \mu\text{m}$ bis 100 mm aufweisen. Die Fiberelemente können in einer Dichte von 1 bis 10^7 Fibern/ cm^2 , bezogen auf eine radiale Querschnittsebene der Fiberelemente, gepackt sein. Das Verhältnis Durchmesser zu Länge kann im Bereich 10^0 bis 10^{-4} liegen. Das Tragelement kann an einem Ende der Fiberelemente angeordnet und die Enden der Fiberelemente umfassend ausgebildet sein, wobei die Stirnflächen der umfaßten Fiberelemente direkt oder indirekt optisch und/oder elektrisch kontaktierbar sind. An beiden Enden der Fiberelemente kann jeweils ein Tragelement angeordnet sein. Ein Tragelement kann aber auch zwischen den beiden Enden der Fiberelemente, beispielsweise mittig, angeordnet sein. Das Tragelement kann als Lochplatte oder als Wickeltragband ausgebildet sein. Das Tragelement kann schließlich aus Bereichen der Fiberelemente ausgebildet sein durch Verschweißen, Verschmelzen, Verkleben oder dergleichen. Die Probenmolekülspezies oder

Probenmolekülspeziesgruppe kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus "DNA, RNA, PNA und Mischungen dieser Nukleinsäuren". Jedes Fiberelement kann Probenmoleküle einer jeweils selektierten, unterschiedlichen Probenmolekülpezies tragen. Es können auch auf einem Fiberelement verschiedene Felder mit verschiedenen Nukleinsäurespezies vorgesehen sein. Jedes Fiberelement kann aber auch Probenmoleküle einer jeweils selektierten, unterschiedlichen Probenmolekülspeziesgruppe tragen, wobei die Gruppenelemente jeder Probenmolekülspeziesgruppe gemeinsam unter Ausbildung von kooperativen Effekten an ein definiertes Targetmolekül binden. Jede Probenmolekülspeziesgruppe kann zwei Gruppenelemente enthalten. Ein solches besonderes Bauteil ist herstellbar in einem Verfahren mit den folgenden Verfahrensstufen: a) es werden eine Mehrzahl von Endlosfibern hergestellt, b) jede Endlosfiber wird durch jeweils ein Fluid enthaltend eine selektierte Probenmolekülspezies oder eine selektierte Probenmolekülspeziesgruppe geleitet, c) die Probenmoleküle der Probenmolekülspezies oder der Probenmolekülspeziesgruppe werden an den Endlosfibern (erfindungsgemäß) immobilisiert, d) optional werden die Endlosfibern zumindest einer Waschverfahrensstufe zugeführt, e) jeder Endlosfiber wird die jeweils in Stufe c) an der Fiber immobilisierte Probenmolekülspezies oder Probenmolekülspeziesgruppe direkt oder indirekt zugeordnet, f) von verschiedenen Endlosfibern wird jeweils ein Fiberelement abgeschnitten und die Fiberelemente verschiedener Endlosfibern werden mit einem Tragelement verbunden oder in Linienkontakt zueinander gebündelt und fixiert. Die Zuordnung kann dabei durch Zwischenschaltung einer Codierung der Endlosfibern

beispielsweise durch Einmischung von Quantum Spots oder Farbstoffen in die Rohmasse der Endlosfibern vor der Extrusion erfolgen. Dann erfolgt die Zuordnung der Nukleinsäurenspezies-/-gruppe zur Position eines
5 Fiberelements in einem fertigen Bauteil erst nach ortsau aufgelöster Bestimmung der Codierung. Damit ist eine exakte Positionierung der Fiberelemente bei der Herstellung des Bauteils obsolet. Solche Bauteile sind beispielsweise verwendbar in einem Verfahren zur De-
10 tektion von Targetmolekülen, wobei optisch kontaktierbare Stirnflächen der Fiberelemente optisch beispielsweise mit einem CCD Array oder über Mikroskopie mit einem Photomultiplier verbunden sind, welche sensitiv für optische Strahlung einer Nach-
15 weiswellenlänge ist, und wobei Sensorelemente des CCD Arrays bzw. Mikroskopie oder deren Positionen jeweils den Fiberelementen zugeordnet sind, mit folgenden Verfahrenstufen: a) dem Biochip wird eine Lösung mit
20 prospektiven Targetmolekülen zugeführt unter Bedingungen, bei welchen Targetmoleküle an Probenmoleküle binden, b) gleichzeitig mit Stufe a) oder hieran anschließend wird der Biochip mit einer Nachweiswellenlänge anregende Primärstrahlung bestrahlt, c) gleichzeitig mit Stufe b) oder hieran anschließend
25 erfolgt eine Auslesung der Signale der Sensorelemente des CCD Arrays oder des Photomultipliers und Aufbereitung sowie Abspeicherung der Signale.

30 Definitionen.

Als Bauteil ist eine Anordnung bezeichnet, welche in diskreten und definierten Flächenbereichen, den

Probenmolekülfeldern, Probenmoleküle einer Probenmolekülspezies oder Probenmolekülspeziesgruppe trägt. In der Regel wird jeder Probenmolekülfeld eines Bauteils eine andere Probenmolekülspeziesgruppe tragen.

- 5 Die Probenmolekülfelder sind adressierbar in dem Sinne, daß eine direkte oder indirekte Zuordnung getroffen ist/wird zwischen jedem Probenmolekülfeld bzw. seiner geometrischen Lage im Rahmen des Bauteils und der von dem Probenmolekülfeld getragenen
- 10 Probenmolekülspeziesgruppe.

Probenmoleküle sind Moleküle, welche mit Targetmolekülen eine spezifische Wechselwirkung eingehen können. Beispiele für solche Wechselwirkungen sind:

- 15 Protein-Aptamer, Nukleinsäure-Nukleinsäure (Crick/Watson oder nicht-Crick/Watson), Nukleinsäure-Ribozym, usw.

- Targetmoleküle sind Moleküle, auf welche eine zu
- 20 analysierende Probe, welche dem Biochip aufgegeben wird, untersucht wird.

- Eine Probenmolekülspezies enthält Probenmoleküle ausschließlich einer Struktur, beispielsweise einer
- 25 Sequenz im Falle von Nukleinsäuren oder Proteinen oder Peptiden.

- Eine Probenmolekülspeziesgruppe enthält als Gruppenelemente zumindest zwei Probenmolekülspezies. Hier-
- 30 bei kann es bei den Probenmolekülspezies um gleichartige oder verschiedenartige Probenmolekültypen handeln.

Kooperative Effekte zwischen Molekülen mehrerer Probenmolekülspezies bzw. Elementen einer Probenmolekülspeziesgruppe und einer Targetmolekülspezies sind dadurch gekennzeichnet, daß der energetische Gewinn
5 durch simultane Wechselwirkung zwischen jeweils den Molekülen der verschiedenen Probenmolekülspezies einerseits und den zwischen den verschiedenen Probenmolekülspezies und dem Targetmolekül insgesamt
10 andererseits größer ist als die Summe der energetischen Gewinne der Wechselwirkungen eines Moleküls jeweils einer Probenmolekülspezies mit einem Molekül der Targetmolekülspezies. Der zusätzlich Energiegewinn rührt also von der Kooperation zwischen den Probenmolekülen verschiedener Probenmolekülspezies im Bindungsfall
15 der Probenmoleküle mit dem Targetmolekül. Im Falle der Nukleinsäuren als Probenmoleküle und Targetmoleküle ist beispielhaft Stacking zu nennen. Der Stacking Effekt ist ein Energiegewinn durch Wechselwirkungen, nämlich Delokalisation der π -Elektronen der hydro-
20 phoben Ringstrukturen benachbarter Basen in doppelsträngigen Nukleinsäuren. Der Stacking Effekt tritt dabei zwischen den Enden der Probennukleinsäuren ein, wenn eine Bindung an ein Targetmolekül derartig stattfindet, daß die Enden der Probennukleinsäuren
25 benachbart zueinander gebunden werden. Im Falle der Proteine können kooperative Effekte aus speziellen Sekundärstrukturen miteinander wechselwirkender Proteine resultieren. Generell wird mit kooperativen Effekten eine höhere Spezifität einer Bindung zwischen
30 Probenmolekülen und einem Targetmolekül erreicht.

Ein Hybridisierungsbereich ist ein Sequenzbereich einer Probennukleinsäure, welche mit einer

Targetnukleinsäure hybridisieren kann. Ein Spacerbereich oder Abstandshalterbereich ist eine an einem Ende der Probennukleinsäure gebundene Gruppe, welche mit einer zweiten Bindungsstelle an dem Probenmolekülfeld gebunden ist. Ein Spacerbereich ist zweckmäßigerweise so gestaltet, daß eine Bindung bzw. Hybridisierung mit einem Targetmolekül nicht stattfinden kann. Ein Spacerbereich kann beispielsweise aus einem nicht-hybridisierenden Oligonukleotid gebildet sein. Mit einem Spacerbereich wird erreicht, daß einerseits der Hybridisierungsbereich in ausreichendem Abstand zur Oberfläche des Probenmolekülfeldes angeordnet wird und andererseits der Hybridisierungsbereich gleichsam flexibilisiert wird und folglich ohne sterische bzw. konformationsbedingte Restriktionen an ein Targetmolekül binden kann.

Als Fiberelemente sind von einer Endlosfiber abgeschnittene Stücke bezeichnet. In der Regel wird der Schnitt in einer Ebene orthogonal zur Längserstreckung der Endlosfiber ausgeführt sein, es ist jedoch selbstverständlich auch eine demgegenüber weniger als 90° abgewinkelte Schnittebene möglich.

Eine Endlosfiber ist ein stabartiges oder fadenartiges Gebilde, mit gegenüber der Länge von Fiberelementen großer Längserstreckung, welches typischerweise mittels Ziehtechnologien, Blasttechnologien und/oder Extrusionstechnologien hergestellt und auf Trommeln oder dergleichen aufgewickelt und bevorratet sein können.

Eine Endlosfiber und/oder ein Fiberelement kann in einer zur Längserstreckung orthogonalen Querschnitts-

ebene die verschiedensten Querschnittsformen aufweisen. Lediglich bevorzugt ist ein im wesentlichen kreisförmiger Querschnitt. Insofern umfaßt der Begriff der Zylindermantelfläche im Rahmen der Erfindung auch
5 Mantelflächen im Falle nicht-kreisförmiger Querschnitte. Insofern bezeichnet der Begriff der radialen Richtung im Rahmen der Erfindung alle Richtungen in einer Querschnittsebene. Insofern bezeichnet schließlich der Durchmesser im Rahmen der Erfindung d
10 $= 2 * (F/2\pi)^{0,5}$, wobei F die Querschnittsfläche (beliebiger Form) ist.

Die Stirnfläche eines Fiberelementes ist durch einen Schnitt durch eine Endlosfiber gebildet.

15

Beabstandung der Fiberelemente meint, daß die Mantelflächen benachbarter Fiberelemente einander nicht berühren oder über Nasen gegeneinander abgestützt sind. Die Kontaktflächen liegen jedenfalls unterhalb
20 von 1% der Gesamtoberfläche der Fiberelemente.

Ein Fiberelementebündel weist in der Regel zueinander coplanare Stirnflächen der gebündelten Fiberelemente auf. Es ist aber auch möglich, innerhalb eines

25 Fiberelementebündels Gruppen von Fiberelementen mit jeweils coplanaren Strinflächen auszubilden, wobei die Strinflächen von Fiberelementen unterschiedlicher Gruppen zueinander nicht coplanar sind.

30 Optische Fiberelemente sind optisch transparent für elektromagnetische Strahlung zumindest in einem Teilbereich der Bereiche IR, sichtbares Licht und/oder UV. Optisch transparent meint, daß die Dämpfung der

elektromagnetischen Strahlung ausreichend gering ist, um eine Detektion an einem Ende eines Fiberelements erzeugter elektromagnetischen Strahlung an dem gegenüberliegenden Ende des Fiberelementes mittels
5 üblicher Detektionstechnologien zu erlauben.

Der Begriff der optischen Kontaktierbarkeit bezeichnet eine Aufbereitung einer Teilfläche eines Fiberelementes, welche die Emission von elektromagnetischer
10 Strahlung aus dem Fiberelement heraus durch die Teilfläche erlaubt. Eine starke Streuung ist möglichst zu vermeiden. Ggf. können die Teilflächen auf geeignete Weise bearbeitet, beispielsweise geglättet oder poliert werden.

15
Ein nicht-poröser Werkstoff weist einen Porositätsgrad (offene Porosität), meßbar mittels der Xylol-Methode, von weniger als 1%, vorzugsweise weniger als 0,1%, noch besser weniger als 0,01%, auf (Porenvolumen/Ge-
20 samtvolumen Werkstück).

Detergenzien sind Grenzflächenspannungen herabsetzende Substanzen, insbesondere Tenside, ionisch, nichtionisch oder ampholytisch.

25
Eine die Benetzung einer Oberfläche fördernde Lösung enthält typischerweise ein oder mehrere Detergenzien. Ob eine Lösung das Kriterium der Förderung der Benetzung erfüllt läßt sich feststellen, indem zwei
30 definierte Kapillaren aus dem Polymerwerkstoff hergestellt werden, wobei eine der Kapillaren mit der Lösung behandelt wird und die zweite dagegen nicht. Dann wird für beide Kapillaren die Kapillaraszension

mit beispielsweise einer Hybridisierungslösung unter gleichen Bedingungen bestimmt. Wenn die Kapillaraszension in der behandelten Kapillaren größer ist als in der unbehandelten, so ist die eingesetzte Lösung die Benetzung fördernd.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von nicht limitierenden Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10

Beispiel 1: Immobilisierung einer Nukleinsäure

Es wurde eine wäßrige Lösung hergestellt enthaltend ein Oligonukleotid mit der Sequenz (T)20-ATT CTA GCT
15 AGT TCA ACT TC (10 nM), $MgCl_2$ (0,2 M), NaCl (1,0 M) und Tris (0,1 M), wobei ein pH von 8 eingestellt war. 1 µl dieser Lösung wurde auf ein Polycarbonat Plättchen aufgebracht und das Polycarbonat Plättchen mit der aufgetragenen Lösung für 1 min. mit UV-Licht der
20 Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Das Plättchen wurde anschließend mit einer Detergens-haltigen Lösung gespült.

25 Beispiel 2: Immobilisierung einer Nukleinsäure (Vergleichsbeispiel)

Es wurde wie in Beispiel 1 vorgegangen mit dem Unterschied, daß eine Bestrahlung mit UV-Licht nicht durch-
30 geführt wurde.

Beispiel 3: Hybridisierung der Immobilisate aus den
Beispielen 1 und 2.

Die Plättchen wurden jeweils in eine Hybridisierungs-
5 lösung enthaltend ein mit Biotin markiertes Oligonuk-
leotid mit der Sequenz GCT GAA ATG GCA ATG GAA GTT GAA
CTA GCT eingebracht und es wurde eine Inkubation über
10 min. bei 20°C durchgeführt. Dannach wurde mit einer
lösung gemäß der Hybridisierungslösung, jedoch ohne
das Oligonukleotid nachgespült. Sodann erfolgte eine
Untersuchung auf Hybridisierung mittels eines
Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und einem col-
orimetrischen Substrat. Das Plättchen aus Beispiel 1
zeigt eine Verfärbung, was die Koppelung des Oligonuk-
15 leotids im Rahmen der Maßnahmen des Beispiels 1
belegt. Das Plättchen aus Beispiel 2 zeigte dagegen
keine Verfärbung; eine Bindung des Oligonukleotids an
der Oberfläche hatte also ohne Bestrahlung nicht
stattgefunden.

20

Beispiel 4: Untersuchung der Bindungsfestigkeit des
Oligonukleotids bei dem Plättchen aus
Beispiel 1.

25

Versuche zur Ablösung des Oligonukleotids von der
Oberfläche des Plättchens mit Lösungen enthaltend SDS,
1M NaOH und/oder chaotropen Reagenzien bei 100 °C und
über 2 h in wäßriger Lösung zeigten, daß das Oligonuk-
30 leotid fest gebunden bleibt. Solche Bedingungen wären
geeignet nicht-covalente Wechselwirkungen zwischen dem
Oligonukleotid und dem Plättchen aufzuheben.

Beispiel 5: Versuche mit anderen Polymerwerkstoffen.

Die Versuche aus den Beispielen 1 bis 4 wurden wieder-
5 holt mit dem Unterschied, daß das Plättchen anstatt
aus Polycarbonat aus Polystyrol oder Polyvinylchlorid
bestand. Diese beiden Polymere enthalten ebenfalls
keine primären oder sekundären Amingruppen. In allen
Versuchen wurde Ergebnisse entsprechend der Beispiel 1
10 bis 4 erhalten.

Beispiel 6: Anwendung einer die Selbstbenetzung
fördernden Lösung.

15

Es wurde ein Immobilisat gemäß dem Beispiel 1 herge-
stellt, mit dem Unterschied, daß der Polymerwerkstoff
Polystyrol und zu einer Mikrotestplatte (MTP) geformt
war. Die MTP wurde dann mit einer die Selbstbenetzung
20 fördernden Lösung enthaltend NaCl (0,75 M), Natrium-
citrat (0,075 M), Tween® 20 (0,05 Gew.-%, bezogen auf
das Gesamtgewicht Lösung) und optional Natriumazid
(0,05 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht Lösung)
gespült.

25

Sodann wurden zur Hybridisierung in einem Kapillarfilm
5 µl einer 10 mM NaOH enthaltend 1 pM eines mit Biotin
markierten Oligonukleotids mit der Sequenz GCT GAA ATG
GCA ATG GAA GTT GAA CTA GCT in die Vertiefung der MTP
30 eingebracht.

Aufgrund der Kombination oberflächengebundenen Deter-
gens und leicht alkalische Hybridisierungslösung

erfolgte nicht nur eine Benetzung der gesamten Vertiefung der MTP durch einen Kapillarfilm, sondern gleichzeitig eine Stabilisierung und Hybridisierung des Targets an die immobilisierten Nukleinsäuren. Nach 5 15 min. Inkubation bei 20 °C konnte eine Hybridisierung mittels eines Streptavidin Peroxidase Konjugats sowie eines colorimetrischen Substrats nachgewiesen werden.

- 10 Kontrollvertiefungen, welche mit einem höheren Volumen (10 bis 200 µl) beschickt wurden, zeigten eine abnehmende Signalstärke.

Weitere Versuche zeigten, daß die Bindung von Detergenzien an die Oberfläche wichtig ist, einerseits zur 15 Erzeugung eines Kapillarfildes und andererseits um eine Stabilisierung/Hybridisierung vorher denaturierter Nukleinsäuren direkt an der Oberfläche zu bewirken. Eine Nukleinsäure, welche in einer neutralen 20 oder alkalischen Lösung (entsprechend 1 bis 200 mM NaOH) denaturiert vorliegt, wird somit ausschließlich bei Kontakt mit der Oberfläche hybridisierungsfähig gemacht.

25

Beispiel 7: Immobilisierung mit verschiedenen Salzen bei verschiedenen Konzentrationen.

Bindung wurde festgestellt für jeweils die folgenden 30 Salze bei verschiedenen pH Werten: $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaCl$, KCl , $LiCl$, NH_4HCO_3 , $NaHCO_3$, Na_2CO_3 , NH_4Cl , $NaHPO_4$, $NaPi$, NH_4Ac , $NaAc$, KAc , $TrisHCl$, HCl , $Tris\ Base$, $KHSO_4$, $K_2S_2O_5$, Tetraethylammoniumchlorid, MOPS, HEPES,

23

Bernsteinsäure, Diethanolamin, Ethanolamin,
NaHCO₃/NaCl/ EDTA, PBS, TAE, Bisulfit und NaBorat.
Dabei war eine Konzentration von 100 mM eingestellt.

5. Einige dieser Salze wurden auf konzentrationsabhängigkeit untersucht. NaCl, NH₄Cl und NaPi bewirkten bis hinunter zu 10 mM 100% Bindung, bei 5 mM 80% Bindung und bei 1 mM und weniger 0% Bindung. NaHCO₃ verhielt sich gleich nur mit lediglich 60% Bindung bei 5 mM.
- 10 MgCl₂ zeigte bis 10 mM 100% Bindung, gefolgt von 80% Bindung bis hinunter zu 0,1 mM. KHSO₄ zeigte 100% Bindung bis hinunter zu 5 mM, 80% Bindung bei 1 mM und 0,5 mM sowie 60% Bindung bei 0,1 mM. NH₄Ac zeigte bis 10 mM 100% Bindung, bis 1 mM 80% Bindung und bis 0,1 mM 40% Bindung. Es ist davon auszugehen, daß auch die weiteren Salze jedenfalls bis hinunter zu 5 mM zumindest 80% Bindung zeigen, jedenfalls bei 10 mM 100% Bindung.

20

25

30

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren mit
weniger als 300 Basenpaaren an einer Oberfläche
5 eines organischen Polymerwerkstoffs, welcher keine
primären und/oder sekundären Amingruppen trägt, mit
den folgenden Verfahrensstufen:
 - a) es wird eine wäßrige Lösung enthaltend
10 eine Nukleinsäure sowie ein gelöstes Salz
hergestellt,
 - b) die Lösung aus Stufe a) wird mit der
Oberfläche des Polymerwerkstoffs
15 kontaktiert,
 - c) es wird die Oberfläche des Po-
lymerwerkstoffs, welche in Kontakt mit
der Lösung steht, mit UV-Licht bestrahlt.
20
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei nach der Ver-
fahrenstufe c) eine Waschverfahrensstufe durchge-
führt wird.
25
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei nach der
Verfahrenstufe c) oder nach der Waschverfahrensstufe
eine Spülverfahrensstufe mit einer wäßrigen Lösung
30 enthaltend ein Detergens durchgeführt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei
der Polymerwerkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe
bestehend aus "Polyethylen (PE), Polycarbonat (PC),
Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS), Polythere-
5 phthalat (PETP), Polyethersulfon (PES), Polyethere-
therketon (PEEK), Polyphenylenoxid (PPO),
Polyphenylensulfid (PPS), Polybutylenterephthalat
(PBT), Polyoxymethylen (POM), Polysulfon (PSU),
Polyetherimid (PEI), Polyamid (PA) und Mischungen
10 sowie Copolymere der Monomere solcher Polymere",
insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend
aus "Polycarbonat (PC), Polyvinylchlorid (PVC),
Polystyrol und Mischungen sowie Copolymere der
Monomere solcher Polymere".
15
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei
die Konzentration der Nukleinsäure in der Lösung im
Bereich von 0,0001 bis 1000 nM, vorzugsweise im
20 Bereich von 1 bis 100 nM, liegt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei
die Gesamtkonzentration des gelösten Salzes in der
25 Lösung im Bereich von 0,1 mM bis 6 M, vorzugsweise
im Bereich von 0,1 bis 3 M, insbesondere 0,1 bis
0,2 M, liegt.
- 30 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei
das Salz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend
aus "MgCl₂, CaCl₂, NaCl, KCl, LiCl, NH₄HCO₃, NaHCO₃,
Na₂CO₃, NH₄Cl, NaHPO₄, NaPi, NH₄Ac, NaAc, KAc,

TrisHCl, HCl, Tris Base, KHSO₄, K₂S₂O₅, Tetraethylammoniumchlorid, MOPS, HEPES, Bernsteinsäure, Diethanolamin, Ethanolamin, NaHCO₃/NaCl/EDTA, PBS, TAE, Bisulfit, NaBorat, und Mischungen dieser Stoffe".

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das UV-Licht eine Wellenlänge im Bereich 1 nm bis 480 nm, insbesondere 100 nm bis 300 nm, aufweist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei das Detergenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Tween 20, Triton X100, Brij-35, Sarkosyl, und Mischungen solcher Substanzen".

10. Immobilisat mit einem Polymerwerkstoff und einer an eine Oberfläche des Polymerwerkstoffes gebundenen Nukleinsäure, erhältlich mittels eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Oberfläche planar oder die Mantelfläche einer Polymerfaser ist.

25

11. Verwendung eines Immobilisats nach Anspruch 10 in einem Verfahren zur Hybridisierung von Nukleinsäuren, wobei die an der Oberfläche des Polymerwerkstoffes immobilisierte Nukleinsäure eine Hybridisierungsregion aufweist, mit den folgenden Verfahrensstufen:

30

- a) die die Nukleinsäure tragende Oberfläche des Immobilisats wird mit einer die Benetzung der Oberfläche fördernden Lösung behandelt,

5

- b) ein Teil der die Nukleinsäure tragenden Oberfläche des Immobilisats wird dann mit einer Hybridisierungslösung kontaktiert, wobei die Hybridisierungslösung die die Nukleinsäure tragende Oberfläche des Im-
- mobilisats selbsttätig vollständig benetzt.

10

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die die Benetzung fördernde Lösung ein Detergenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Tween 20, Triton X100, Brij-35, Sarkosyl, und Mischungen solcher Substanzen" enthält.

20

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Hybridisierungslösung einen pH von 6,5 bis 11, vorzugsweise 7 bis 9, aufweist.

25

30

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. August 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/62963 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/00812**

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Februar 2001 (27.02.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 10 376.6 28. Februar 2000 (28.02.2000) DE
100 53 393.0 20. Oktober 2000 (20.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **VARIOM BIOTECHNOLOGY AG [DE/DE];**
Münzstrasse 23, 10178 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ÖZKAN, Derya**
[DE/DE]; Münzstrasse 23, 10178 Berlin (DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Gelfertstrasse
56, 14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AL, AM, AT, AU,**
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,

DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,**
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: **25. April 2002**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR IMMOBILIZING NUCLEIC ACIDS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR IMMOBILISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN**

(57) Abstract: The invention relates to a method for immobilizing nucleic acids on one of the surfaces of a non-porous organic polymeric material which does not carry any primary and/or secondary amine groups. The inventive method comprises the following steps: (a) an aqueous solution containing a nucleic acid as well as a dissolved salt is prepared, whereby the cation of the salt is selected from the group comprised of sodium, magnesium and of mixtures of these cations; (b) the solution mentioned in step (a) is brought into contact with the surface of the polymeric material, and; (c) the surface of the polymeric material, which is in contact with the solution, is irradiated with UV light after step (b) or simultaneously thereto.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt ein Verfahren zur Immobilisierung von Nukleinsäuren an einer Oberfläche eines nichtporösen organischen Polymerwerkstoffs, welcher keine primären und/oder sekundären Amingruppen trägt, mit den folgenden Verfahrensstufen: (a) es wird eine wässrige Lösung enthaltend eine Nukleinsäure sowie ein gelöstes Salz, wobei das Kation des Salzes ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Natrium, Magnesium und Mischungen dieser Kationen", hergestellt, (b) die Lösung aus Stufe (a) wird mit der Oberfläche des Polymerwerkstoffs kontaktiert, (c) nach oder gleichzeitig mit Stufe (b) wird die Oberfläche des Polymerwerkstoffs, welche in Kontakt mit der Lösung steht, mit UV-Licht bestrahlt.

WO 01/62963 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/DE 01/00812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 741 638 A (YAMANE AKIO) 21 April 1998 (1998-04-21) claims 1,4; examples 2,4 ---	1-13
A	US 5 663 318 A (PEGG RANDALL KEVIN ET AL) 2 September 1997 (1997-09-02) column 2, line 29 -column 4, line 57 ---	1-13
A	US 5 610 287 A (NIKIFOROV THEO ET AL) 11 March 1997 (1997-03-11) column 4, line 27 -column 5, line 40 ---	1-13
A	GB 2 197 720 A (NAT RES DEV) 25 May 1988 (1988-05-25) the whole document --- -/--	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 February 2002

Date of mailing of the international search report

27/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. national Application No
PCT/DE 01/00812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIRAYAMA H ET AL: "Improved immobilization of DNA to microwell plates for DNA-DNA hybridization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 24, no. 20, 1996, pages 4098-99, XP002189260 the whole document	1-13
A	WO 89 11548 A (CETUS CORP) 30 November 1989 (1989-11-30) page 7 -page 11	1
A	US 5 858 653 A (AMOS RICHARD A ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/00812

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5741638	A	21-04-1998	DE 69112309 D1	28-09-1995
			DE 69112309 T2	25-01-1996
			EP 0466367 A1	15-01-1992
			JP 2792757 B2	03-09-1998
			JP 5192198 A	03-08-1993
			JP 2972685 B2	08-11-1999
			JP 10179199 A	07-07-1998
US 5663318	A	02-09-1997	US 5436147 A	25-07-1995
			US 5279955 A	18-01-1994
US 5610287	A	11-03-1997	AU 682741 B2	16-10-1997
			AU 1303295 A	27-06-1995
			CA 2155634 A1	15-06-1995
			EP 0684952 A1	06-12-1995
			WO 9515970 A1	15-06-1995
			US 5762876 A	09-06-1998
GB 2197720	A	25-05-1988	NONE	
WO 8911548	A	30-11-1989	AT 173508 T	15-12-1998
			AU 632494 B2	07-01-1993
			AU 3754289 A	12-12-1989
			DE 68928853 D1	24-12-1998
			DE 68928853 T2	05-08-1999
			EP 0451141 A1	16-10-1991
			IE 164389 L	20-11-1989
			IL 90358 A	18-08-1993
			JP 2897959 B2	31-05-1999
			JP 3504328 T	26-09-1991
			WO 8911548 A1	30-11-1989
US 5858653	A	12-01-1999	AU 737391 B2	16-08-2001
			AU 9582898 A	23-04-1999
			EP 1019424 A2	19-07-2000
			JP 2001518604 T	16-10-2001
			WO 9916907 A2	08-04-1999
			US 2001014448 A1	16-08-2001

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETERecherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 741 638 A (YAMANE AKIO) 21. April 1998 (1998-04-21) Ansprüche 1,4; Beispiele 2,4 ---	1-13
A	US 5 663 318 A (PEGG RANDALL KEVIN ET AL) 2. September 1997 (1997-09-02) Spalte 2, Zeile 29 -Spalte 4, Zeile 57 ---	1-13
A	US 5 610 287 A (NIKIFOROV THEO ET AL) 11. März 1997 (1997-03-11) Spalte 4, Zeile 27 -Spalte 5, Zeile 40 ---	1-13
A	GB 2 197 720 A (NAT RES DEV) 25. Mai 1988 (1988-05-25) das ganze Dokument --- -/--	1-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Februar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/02/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Osborne, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HIRAYAMA H ET AL: "Improved immobilization of DNA to microwell plates for DNA-DNA hybridization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 24, Nr. 20, 1996, Seiten 4098-99, XP002189260 das ganze Dokument ----	1-13
A	WO 89 11548 A (CETUS CORP) 30. November 1989 (1989-11-30) Seite 7 -Seite 11 ----	1
A	US 5 858 653 A (AMOS RICHARD A ET AL) 12. Januar 1999 (1999-01-12) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. ationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00812

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5741638	A	21-04-1998	DE 69112309 D1	28-09-1995
			DE 69112309 T2	25-01-1996
			EP 0466367 A1	15-01-1992
			JP 2792757 B2	03-09-1998
			JP 5192198 A	03-08-1993
			JP 2972685 B2	08-11-1999
			JP 10179199 A	07-07-1998
US 5663318	A	02-09-1997	US 5436147 A	25-07-1995
			US 5279955 A	18-01-1994
US 5610287	A	11-03-1997	AU 682741 B2	16-10-1997
			AU 1303295 A	27-06-1995
			CA 2155634 A1	15-06-1995
			EP 0684952 A1	06-12-1995
			WO 9515970 A1	15-06-1995
			US 5762876 A	09-06-1998
GB 2197720	A	25-05-1988	KEINE	
WO 8911548	A	30-11-1989	AT 173508 T	15-12-1998
			AU 632494 B2	07-01-1993
			AU 3754289 A	12-12-1989
			DE 68928853 D1	24-12-1998
			DE 68928853 T2	05-08-1999
			EP 0451141 A1	16-10-1991
			IE 164389 L	20-11-1989
			IL 90358 A	18-08-1993
			JP 2897959 B2	31-05-1999
			JP 3504328 T	26-09-1991
			WO 8911548 A1	30-11-1989
US 5858653	A	12-01-1999	AU 737391 B2	16-08-2001
			AU 9582898 A	23-04-1999
			EP 1019424 A2	19-07-2000
			JP 2001518604 T	16-10-2001
			WO 9916907 A2	08-04-1999
			US 2001014448 A1	16-08-2001

THIS PAGE BLANK (USPTO)